

RECEIVED

OCT 30 2002

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

訂正版

TECH CENTER 1600/2900

9/856640

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年4月5日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/022833 A1

- (51) 国際特許分類: A23K 1/16 (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06528
- (22) 国際出願日: 2000年9月22日 (22.09.2000) (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, IL, KR, NO, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11-279337 1999年9月30日 (30.09.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日石三菱株式会社 (NIPPON MITSUBISHI OIL CORPORATION) [JP/JP]; 〒105-8412 東京都港区西新橋一丁目3番12号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 坪倉 章 (TSUBOKURA, Akira) [JP/JP]; 米田 久 (YONEDA, Hisashi) [JP/JP]; 水田美能 (MIZUTA, Haruyoshi) [JP/JP]; 〒231-0815 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日石三菱株式会社 中央技術研究所内 Kanagawa (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (48) この訂正版の公開日: 2002年9月12日
- (15) 訂正情報:  
PCTガゼット セクションIIの No.37/2002 (2002年9月12日)を参照  
先の訂正:  
PCTガゼット セクションIIの No.36/2001 (2001年9月7日)を参照
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PIGMENT-CONTAINING MATERIALS TO BE ADDED TO FEEDS

(54) 発明の名称: 飼料添加用色素含有物

(57) Abstract: Pigment-containing materials to be added to feeds which comprise microbial culture precipitate containing carotenoid compounds at a high concentration. Because of being resistant to oxygen, light, etc., these materials can be stored in a stable state over a long time.

(57) 要約:

カロテノイド化合物を高濃度含有する微生物培養沈殿物よりなる飼料添加用色素含有物を提供する。この飼料添加用色素含有物は、酸素や光等に対し耐性を示し、長期間安定的に保存することが可能である。

WO 01/022833 A1



## 明細書

### 飼料添加用色素含有物

#### 技術分野

本発明は、カロテノイド化合物を含有する微生物培養沈殿物よりなる飼料添加用色素含有物に関する。

#### 背景技術

カロテノイド化合物は長鎖のポリエン構造、多くは炭素数40のテトラテルペノイドを持ち、黄、橙、赤ないし紫色を呈する色素群の総称であり、具体的には $\beta$ -カロテン、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、エキネノン、アドニルビン、アドニキサンチン等といった化合物をさす。これらの化合物は天然色素として飼料添加物、食品添加物、医薬品等として有用である。例えば、アスタキサンチンは養殖魚であるサケ、マス、マダイ等の体色改善剤のごとき飼料添加物として、また安全な天然食品添加物として産業上価値が高い。アドニキサンチンは工業的製造法が確立することによりアスタキサンチンと同様に飼料添加物、食品添加物、医薬品としての使用が期待される。カンタキサンチンは飼料添加物、食品添加物、化粧品等として使用され、ゼアキサンチンは飼料添加物、食品添加物として使用されている。さらにエキネノン、アドニルビンも飼料添加物、食品添加物等としての使用が期待される。これらカロテノイド化合物の製造方法としては、化学合成法、微生物による産生方法、天然物からの抽出法などが知られており、すでにアスタキサンチン、カンタキサンチンについては化学合成品が市販されている。微生物による産生方法は化学合成法に比較して、金属触媒、溶剤を用いず製造できることから安全性が高いことが利点である。一般的にカロテノイド化合物は酸素、光に不安定であるが、微生物が産生するカロテノイド化合物は微生物菌体の内部に蓄積されるため、細胞膜、細胞壁、その他の酸化防止剤によって安定的に保たれる。飼料添加物等として用いる場合、保存安定性が高いことは利点であり、微生物菌体そのものを用いることができれば大きな利点である。さらに、菌体内のカロテノイド化合物を抽出精製して用いるのであ

れば、安全性に問題のある塩素系溶媒などを用いる必要がある。以上よりカロテノイド化合物を含有する微生物よりなる微生物培養沈殿物を飼料添加物等に用いることは大きな利点を有する。その際、カロテノイド化合物を生産する微生物の細胞壁が強固である場合はそのままの菌体で供給しても吸収効率は極めて低く菌体を機械的に粉碎、あるいは化学薬品、酵素などで分解する必要がありコストの面で問題がある。しかも菌体を分解した状態ではカロテノイド化合物の安定性が低下する問題もある。さらに、微生物培養沈殿物中のカロテノイド化合物の含有量が低い場合、飼料を製造する際に、微生物培養沈殿物が多く必要とされ操作性がわるく運送コストも嵩む、飼料の栄養学的なバランスも崩すという問題もある。しかしながら、強固な細胞壁を持たないことから菌体内部に蓄積されるカロテノイド化合物が容易に利用され易い長所を有する微生物よりなり、さらにカロテノイド化合物を3質量%以上含有する微生物培養沈殿物よりなる飼料添加用色素含有物は見いだされていなかった。

カロテノイド化合物の中でもアスタキサンチンはサケ、マス、マダイ等の魚類、エビ、カニ等の甲殻類に含まれる赤色系の色素そのものであり、色調が美しい点で有用であり、上述のように飼料添加物、天然食品添加物として広く使用されている。アスタキサンチンを生産するとして知られている赤色酵母ファフィア・ロドチーマ (Phaffia rhodozyma) は酵母であるために、細胞壁が強固であるという問題を有する。細菌によるアスタキサンチンの生産は以下のものが知られているがいずれも乾燥菌体重量当たりの含有量は低い。ブレヴィバクテリウム (Brevibacterium) 属に属する細菌 Brevibacterium No. 103 株は乾燥菌体重量当たりわずか0.003%のアスタキサンチンを生産するにすぎない (Journal of General and Applied Microbiology, 15, 127, 1969)。またパラコッカス (Paracoccus) 属に属する細菌 Paracoccus marcusii DSM 11574 株は乾燥菌体重量当たりわずか0.022%のアスタキサンチンを生産するにすぎない (WO 99/6586)。

本発明は、天然色素として有用なカロテノイド化合物を高濃度含有する微生物培養沈殿物よりなる飼料添加用色素含有物を提供することを目的とするものであ

る。

### 発明の開示

上記課題を解決するため、本発明は、以下の手段を提供する。

1. カロテノイド化合物を3質量%以上含有する微生物培養沈殿物よりなる飼料添加用色素含有物。
2. カロテノイド化合物中の40質量%以上がアスタキサンチンであることを特徴とする上記の飼料添加用色素含有物。
3. 微生物培養沈殿物中の微生物の16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と98%以上の相同性を有することを特徴とする上記の飼料添加用色素含有物。
4. 微生物培養沈殿物中の微生物がE-396株もしくはその変異株であることを特徴とする上記の飼料添加用色素含有物。

なお、本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願（特願平11-279337号）の明細書に記載される内容を包含する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の飼料添加用色素含有物は微生物培養沈殿物よりなる。まず最初に、本発明の微生物培養沈殿物を説明する。本発明の微生物培養沈殿物とは、カロテノイド化合物を生産する微生物、主に菌体を培養してカロテノイド化合物を生産させ、その培養液を濾過、遠心分離機等により処理し、ある程度水分を除去したものを指す。カロテノイド化合物を生産する菌株の培養方法はカロテノイド化合物を生成する条件であればいずれの方法でもよいが、例えば、以下のような方法を採用できる。すなわち、培地としては生産菌が生育に必要な炭素源、窒素源、無機塩、および必要であれば特殊な要求物質（例えば、ビタミン、アミノ酸、核酸塩基等）を含むものを使用する。炭素源としてはグルコース、シュークロース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、マルトース等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール等のアルコール類等が挙げられる。添加割合は炭素源の種類により異なる

が、通常培地 1L 当たり 1~100g、好ましくは 2~50g である。窒素源としては、例えば硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、尿素等の 1 種または 2 種以上が用いられる。添加割合は窒素源の種類により異なるが、通常培地 1L に対し 0.1g~10g、好ましくは 1~3g である。無機塩としてはリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸鉄、塩化鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム等の 1 種または 2 種以上が用いられる。添加割合は無機塩の種類により異なるが、通常培地 1L に対し 0.001~10g である。特殊な要求物質としてはビタミン類、核酸類、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、乾燥酵母、大豆粕、大豆油、オリーブ油、トウモロコシ油、アマニ油、等の 1 種または 2 種以上が用いられる。添加割合は特殊な要求物質の種類により異なるが、通常、培地 1L に対し 1g~200g、好ましくは 10~100g である。培地の pH は 2~12、好ましくは 6~10 に調整する。培養条件は 15~80℃、好ましくは 20~35℃の温度であり、通常 1 日~20 日間、好ましくは 2~8 日間振とう培養あるいは通気攪拌培養を行う。

次に、以上の方法により得られた培養液から水分を除去する作業を行う。本発明の飼料添加用色素含有物を得るために、どの程度の水分除去が必要かは培養液の状態（色素含有量等）により異なるが、一般にまず濾過の作業を行いさらに水分の除去が必要であれば沈殿物の乾燥を行う。濾過の方法は、通常の濾過法、遠心分離法などにより行うことができる。得られた沈殿物は塩類、糖類などの培地成分が溶解した水および沈殿物を含むため、沈殿物中のカロテノイド化合物の含有量をさらに向上させるため、培養液から分離した沈殿物に水を加え懸濁した後、再度沈殿物を分離することも有効である。この工程により、水に溶解している培地成分等のある程度除去することができる。さらに沈殿物中のカロテノイド化合物の含有量を上げる必要がある場合には、沈殿物を乾燥して水分を除去する方法をとることが可能である。乾燥の方法としては、通常の噴霧乾燥、ドラム乾燥、凍結乾燥などが挙げられる。

以上の方法で得られた微生物培養沈殿物は飼料添加用色素含有物として良好に

使用することができる。本発明の飼料添加用含有物はカロテノイド化合物の分解を防止する目的でBHT（ブチルヒドロキシトルエン）、エトキシキン、ビタミンEなどの酸化防止剤を添加することも可能である。さらにこれらの表面をゼラチンなどで被覆しても良い。

次に本発明で使用される微生物について説明する。本発明で使用される微生物は、細菌、酵母等培養によりカロテノイド化合物を生産し、その培養沈殿物中に3質量%以上のカロテノイド化合物を含有できるものであれば特に限定されないが、培養中に微生物内に蓄積されたカロテノイド化合物を利用することを考え、細胞壁が薄く色素の有効な利用が可能である細菌を用いることが好ましい。特に、増殖速度の速さ、カロテノイド化合物の生産性から、16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と実質的に相同であることが特に好ましい。

ここで言う実質的に相同とはDNAの塩基配列決定の際のエラー頻度等を考慮し98%以上の相同性であることを意味する。

上記配列と実質的に相同な配列を有する細菌は、培養により、菌体中にアスタキサンチン、アドニキサンチン、 $\beta$ -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、 $\beta$ -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン等のカロテノイド化合物が混合物として蓄積する。菌体中に含まれるカロテノイド化合物の生成比率は、例えば、培養における好気条件を変えることにより、カロテノイド化合物の生成比率を変えることができる。一例として培養液中の溶存酸素濃度を高めることによりアドニキサンチンの生成比率を高めることができる。また、変異により、カロテノイド化合物の生成比率の変化した菌体を得ることも可能である。変異の方法としては、X線照射、紫外線照射等の物理的方法、化学変異剤、例えばNTG（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine）とEMS（ethylmethane sulfonate）等による変異処理のような化学的方法を用いた人為的変異処理等を用いることが可能である。

該細菌のうち、生成するカロテノイド化合物のうちの40質量%以上がアスタキサンチンであるものとして、E-396株を挙げることができる。この株は、発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国

茨城県つくば市東1丁目1番)に平成5年4月27日にFERM BP-4283として寄託された。この菌株の菌学的性質は、特開平7-79796号公報、特開平8-9964号公報、特開平9-308481号公報に記載されている通りである。また、この菌株の16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列は、配列番号1に示すとおりである。

16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が本発明の特定の配列と実質的に相同である菌株が生産するアスタキサンチンは(3S, 3'S)-アスタキサンチンでありその純度はほぼ100%である。天然物であるザリガニ、ヘマトコッカス、サケ、マス、マダイに存在するアスタキサンチンは(3S, 3'S)体の含有率が高いことが知られている。一方ファフィア・ロドチーマは(3R, 3'R)体の含有率が多く天然に存在するアスタキサンチンとは反対の絶対配置を持つことが知られている。本発明の菌株が生産するアスタキサンチンは100%の(3S, 3'S)-アスタキサンチンであり天然において多数を占めるアスタキサンチンと同一の絶対配置を有することは産業上価値が高い。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 〔実施例1〕

第1表の組成からなる培地6mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株(FERM BP-4283)を1白金耳植菌し28℃で2日間350rpmの往復振とう培養を行った。この培養液2mLを上と同組成の培地が100mL入った500mL容量の坂口フラスコ1本に植菌し28℃、6日間100rpmの往復振とう培養を行った。培養液100mLから遠心分離により菌体(湿重量3.2g)を得た。この菌体にイオン交換水50mLを添加し十分懸濁した後、再度遠心分離機を行い菌体(湿重量3.1g)を得た。次いで菌体3.1gを凍結乾燥し菌体乾燥物1.1gを得た。乾燥菌体物中のカロテノイド含有量を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ第2表の組成であった。また菌体乾燥物中の水分含量は2.5%であった。



表 1

| 組成   | 添加量 g / L |
|--|-----------|
| 酵母エキス  | 2 0       |
| ペプトン   | 5         |
| しよ糖  | 1 0 0     |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1. 5      |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 3. 8      |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0. 5      |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0. 0 1    |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$            | 0. 0 1    |
| pH 7 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で調整)                 |           |

表 2

| カロテノイド化合物     | 含有量 mg/g |
|---------------|----------|
| $\beta$ -カロテン | 1. 6     |
| エキネノン         | 1. 9     |
| 3-ヒドロキシエキネノン  | 0. 9     |
| カンタキサンチン      | 2. 3     |
| アドニルビン        | 5. 6     |
| アスタキサンチン      | 13. 0    |
| アステロイデノン      | 0. 6     |
| アドニキサンチン      | 5. 3     |
| ゼアキサンチン       | 0. 0 1   |
| 総カロテノイド       | 31. 2    |

## 〔実施例 2〕

E-396 株 (FERM BP-4283) を NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) で変異処理し、赤色の色調が濃いコロニーを選択した。これらの株の培養液中のカロテノイド化合物を分析し、アスタキサンチンの生産量が向上した変異株を選択した。第 1 表の組成からなる培地 5 mL を直径 18mm の試験管に入れ 121℃、15 分間蒸気殺菌した。これに変異株を 1 白金耳植菌し 30℃ で 2 日間 300rpm の往復振とう培養を行った。この培養液 2 mL を上と同組成の培地が 100mL 入った 500mL 容量の坂口フラスコに植菌し 29℃、2 日間 120 rpm の往復振とう培養を行った。

次にこの培養液 800 mL 分を表 3 の組成の培地が 20L 入った 30L 容量の発酵槽に植菌し 29℃、400 rpm、1.0vvm の好気培養を 150 時間行った。培養液 18L からシャープレス型遠心分離機により菌体（湿重量 600 g）を得た。この菌体に水道水を 20L 添加し十分懸濁した後、再度シャープレス型遠心分離機により菌体（湿重量 530 g）を得た。次いで菌体 530 g に水道水を 1.5 L 添加し十分懸濁後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥し菌体乾燥物 200 g を得た。運転条件は入口空気温度 210℃、出口空気温度 105℃、懸濁液供給速度 38 mL/min で行った。乾燥菌体物中のカロテノイド含有を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ第 4 表の組成であった。また乾燥菌体物中の水分含量は 3.1% であった。

表 3

| 組成   | 添加量 g / L |
|--|-----------|
| 酵母エキス  | 20        |
| ペプトン   | 5         |
| グルコース  | 120       |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1.5       |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 3.8       |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0.5       |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0.01      |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$            | 0.01      |
| pH 7 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で調整)                 |           |

表 4

| カロテノイド化合物     | 含有量 mg/g |
|---------------|----------|
| $\beta$ -カロテン | 0.7      |
| エキネノン         | 1.1      |
| 3-ヒドロキシエキネノン  | 0.6      |
| カンタキサンチン      | 1.7      |
| アドニルビン        | 5.4      |
| アスタキサンチン      | 19.4     |
| アステロイデノン      | 0.8      |
| アドニキサンチン      | 5.5      |
| ゼアキサンチン       | 0.02     |
| 総カロテノイド       | 35.2     |

### 発明の効果

本発明の飼料添加用色素含有物は、カロテノイドが微生物の細胞膜、細胞壁等の作用により安定化されているため、酸素や光などに対し耐性を示し、長期間安定的に保存することが可能である。

なお、本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

1. カロテノイド化合物を3質量%以上含有する微生物培養沈殿物よりなる飼料添加用色素含有物。
2. カロテノイド化合物中の40質量%以上がアスタキサンチンであることを特徴とする請求項1に記載の飼料添加用色素含有物。
3. 微生物培養沈殿物中の微生物の16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載の塩基配列と98%以上の相同性を有することを特徴とする請求項1または2に記載の飼料添加用色素含有物。
4. 微生物培養沈殿物中の微生物がE-396株もしくはその変異株であることを特徴とする請求項3に記載の飼料添加用色素含有物。

## SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON MITSUBISHI OIL CORPORATION

<120> A pigment-containing substance for feed additives

<130> PH-1063-PCT

<140>

<141>

<150> JP 279337/1999

<151> 30-SEP-1999

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Unknown

<400> 1

agtttgatcc tggctcagaa cgaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagcga 60  
gaccttcggg tctagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120  
aatagccccc ggaaactggg agtaataccg tatacgccct ttgggggaaa gatttatcgg 180  
agaaggatcg gcccgcgttg gattaggtag ttggtggggt aatggcccac caagccgacg 240  
atccatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gccagactc 300



ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggggc aaccctgata tagccatgcc 360  
gcgtgagtga tgaaggcctt agggttgtaa agctctttca gctgggaaga taatgacggt 420  
accagcagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggagggggct 480  
agcgttggtc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc ggactggaaa gtcagagggtg 540  
aaatcccagg gctcaacctt ggaactgcct ttgaaactat cagtctggag ttcgagagag 600  
gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttcggaggaa caccagtggc 660  
gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgagggtcga aagcgtgggg agcaaacagg 720  
attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct 780  
tgtcgggtgc acacctaacg gattaagcat tccgcctggg gactacggtc gcaagattaa 840  
aactcaaagg aattgacggg ggcccgaca agcgggtggag catgtgggtt aattcgaagc 900  
aacgcgcaga accttacc aa cccttgacat ggacaggacc ctggagagat tcagctttct 960  
cgtaagagac ctgcacacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttc 1020  
ggttaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagtgt ccagcaattc agttgggaac 1080  
tctatggaaa ctgccgatga taagtcggag gaagggtgtg atgacgtcaa gtcctcatgg 1140  
gccttacggg ttgggtctaca cacgtgctac aatgggtggg acagtgggtt aatccccaaa 1200  
agccatctca gttcggattg tcctctgcaa ctgaggggca tgaagtggga atcgctagta 1260  
atcgcggaac agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cggccgtcac 1320  
accatgggag ttggttctac ccgacgacgn tgcgctaacc ttcggggggc aggcggccac 1380  
ggtaggatca gcgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggctg 1440  
gatcacctcc tt 1452





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> A23K 1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A23K 1/16, C12P 23/00, C12N 1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPIDS, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | JP, 9-308481, A (NIPPON OIL COMPANY, LTD.),<br>02 December, 1997 (02.12.97) (Family: none)  | 1-4                   |
| X         | EP, 635576, A1 (Nippon Oil KK),<br>25 January, 1995 (25.01.95)<br>& JP, 7-79796, A & NO, 9402731, A<br>& CA, 2128549, A & US, 5607839, A<br>& US, 5858761, A & EP, 635576, B1 | 1-4                   |
| A         | EP, 747483, A2 (Hoffmann la Roche & CO AG F),<br>11 December, 1996 (11.12.96)<br>& JP, 9-23888, A & US, 6087152, A<br>& US, 6124113, A & CN, 1141952, A                       | 1-4                   |
| A         | JP, 6-165684, A (Kaiyo Bio Technology Kenkyusho K.K.),<br>14 June, 1994 (14.06.94) (Family: none)   | 1-4                   |
| A         | JP, 5-328979, A (Kaiyo Bio Technology Kenkyusho K.K.),<br>14 December, 1993 (14.12.93)  | 1-4                   |
| A         | EP, 454024, A (Phillips Petroleum CO),<br>30 October, 1991 (30.10.91)   | 1-4                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 December, 2000 (26.12.00)Date of mailing of the international search report  
16 January, 2001 (16.01.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06528

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                    | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
|           | & NO, 9101577, A      & AU, 9173639, A<br>& CA, 2033666, A      & FI, 9101948, A<br>& JP, 4-228064, A |                       |

E P

• **UIS**

P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

|                               |   |                         |  |
|-------------------------------|---|-------------------------|--|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 PH-1063-PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 |                         |  |
| 国際出願番号<br>PCT/JPO0/06528      | 国際出願日<br>(日.月.年) 22.09.00                           | 優先日<br>(日.月.年) 30.09.99 |  |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>日石三菱株式会社      |   |                         |  |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



|  |  |  |
|--|--|--|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  |  |  |
| Int. Cl. 7 A23K 1/16   |  |  |
| B. 調査を行った分野  |  |  |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))   |  |  |
| Int. Cl. 7 A23K 1/16, C12P 23/00, C12N 1/20  |  |  |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの   |  |  |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  |  |  |
| WPIDS, BIOSIS  |  |  |
| C. 関連すると認められる文献  |  |  |
| 引用文献の<br>カテゴリー*  | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号   |
| X  | JP, 9-308481, A (日本石油株式会社) 2. 12月. 1997 (02. 12. 97)<br>ファミリーなし  | 1-4  |
| X  | EP, 635576, A1 (Nippon Oil KK) 25. 1月. 1995 (25. 01. 95)<br>& JP, 7-79796, A & NO, 9402731, A & CA, 2128549, A<br>& US, 5607839, A & US, 5858761, A & EP, 635576, B1 | 1-4  |
| A  | EP, 747483, A2 (Hoffmann la Roche & CO AG F) 11. 12月. 1996 (11. 12. 96) & JP, 9-23888, A & US, 6087152, A & US, 6124113, A<br>& CN, 1141952, A                       | 1-4  |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。  |  |  |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |  |  |
| 国際調査を完了した日   | 26. 12. 00   | 国際調査報告の発送日   |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号  |  | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>長 井 啓 子<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3236 |



| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | JP, 6-165684, A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 14. 6月. 1994 (14. 06. 94) ファミリーなし   | 1-4              |
| A                     | JP, 5-328979, A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 14. 12月. 1993 (14. 12. 93)  | 1-4              |
| A                     | EP, 454024, A (Phillips Petroleum CO) 30. 10月. 1991 (30. 10. 91)<br>& NO, 9101577, A & AU, 9173639, A & CA, 2033666, A<br>& FI, 9101948, A & JP, 4-228064, A | 1-4              |







# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

To:  
HIRAKI, Yusuke  
Toranomon No. 5 Mori Building 3rd  
floor  
17-1, Toranomon 1-chome  
Minato-ku, Tokyo 105-0001  
JAPON

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>05 April 2001 (05.04.01) |  | IMPORTANT NOTICE   |  |
| Applicant's or agent's file reference<br>PH-1063-PCT         |  |  |  |
| International application No.<br>PCT/JP00/06528              | International filing date (day/month/year)<br>22 September 2000 (22.09.00) | Priority date (day/month/year)<br>30 September 1999 (30.09.99) |  |
| Applicant<br>NIPPON MITSUBISHI OIL CORPORATION et al         |  |  |  |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
CA, CN, EP, IL, NO

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 05 April 2001 (05.04.01) under No. WO 01/22833

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>J. Zahra  |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35   | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

PH-1063-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年09月22日（22.09.2000）金曜日 13時50分47秒

|        |   |  |
|--------|---|--|
| 0      | 受理官庁記入欄   |  |
| 0-1    | 国際出願番号.   |  |
| 0-2    | 国際出願日   |  |
| 0-3    | (受付印)   |  |
| 0-4    | 様式-PCT/R0/101<br>この特許協力条約に基づく国際出願願書は、<br>右記によって作成された。 | PCT-EASY Version 2.91<br>(updated 01.07.2000)                                      |
| 0-5    | 申立て<br>出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。            |  |
| 0-6    | 出願人によって指定された受理官庁                                      | 日本国特許庁 (R0/JP)   |
| 0-7    | 出願人又は代理人の書類記号   | PH-1063-PCT  |
| I      | 発明の名称   | 飼料添加用色素含有物   |
| II     | 出願人   | 出願人である (applicant only)  |
| II-1   | この欄に記載した者は  | 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)                                     |
| II-2   | 右の指定国についての出願人である。                                     | 日石三菱株式会社   |
| II-4ja | 名称  | NIPPON MITSUBISHI OIL CORPORATION  |
| II-4en | Name  | 105-8412 日本国   |
| II-5ja | あて名:  | 東京都 港区   |
| II-5en | Address:  | 西新橋一丁目3番12号<br>3-12, Nishi-shimbashi 1-chome<br>Minato-ku, Tokyo 105-8412<br>Japan |
| II-6   | 国籍 (国名)   | 日本国 JP   |
| II-7   | 住所 (国名)   | 日本国 JP   |
| II-8   | 電話番号  | 03-3502-9174   |
| II-9   | ファクシミリ番号  | 03-3502-9367   |



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年09月22日（22.09.2000）金曜日 13時50分47秒

PH-1063-PCT

|           |                    |   |
|-----------|--------------------|---|
| III-1     | その他の出願人又は発明者       | 出願人及び発明者である (applicant and inventor)<br>米国のみ (US only)<br>坪倉 章<br>TSUBOKURA, Akira<br>231-0815 日本国<br>神奈川県 横浜市<br>中区千鳥町8番地<br>日石三菱株式会社 中央技術研究所内<br>c/o Central Technical Research Laboratory,<br>Nippon Mitsubishi Oil Corporation<br>8, Chidori-cho, Naka-ku<br>Yokohama-shi, Kanagawa 231-0815<br>Japan<br>日本国 JP |
| III-1-1   | この欄に記載した者は         |   |
| III-1-2   | 右の指定国についての出願人である。  |   |
| III-1-4ja | 氏名(姓名)             |   |
| III-1-4en | Name (LAST, First) |   |
| III-1-5ja | あて名:               |   |
| III-1-5en | Address:           |   |
| III-1-6   | 国籍 (国名)            | 日本国 JP  |
| III-1-7   | 住所 (国名)            | 日本国 JP  |
| III-2     | その他の出願人又は発明者       | 出願人及び発明者である (applicant and inventor)<br>米国のみ (US only)<br>米田 久<br>YONEDA, Hisahi<br>231-0815 日本国<br>神奈川県 横浜市<br>中区千鳥町8番地<br>日石三菱株式会社 中央技術研究所内<br>c/o Central Technical Research Laboratory,<br>Nippon Mitsubishi Oil Corporation<br>8, Chidori-cho, Naka-ku<br>Yokohama-shi, Kanagawa 231-0815<br>Japan<br>日本国 JP   |
| III-2-1   | この欄に記載した者は         |   |
| III-2-2   | 右の指定国についての出願人である。  |   |
| III-2-4ja | 氏名(姓名)             |   |
| III-2-4en | Name (LAST, First) |   |
| III-2-5ja | あて名:               |   |
| III-2-5en | Address:           |   |
| III-2-6   | 国籍 (国名)            | 日本国 JP  |
| III-2-7   | 住所 (国名)            | 日本国 JP  |



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

PH-1063-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年09月22日（22.09.2000）金曜日 13時50分47秒

|  |   |   |
|--|---|---|
| III-3<br>III-3-1                               | その他の出願人又は発明者<br>この欄に記載した者は  | 出願人及び発明者である (applicant and inventor)<br>米国のみ (US only)  |
| III-3-2<br>III-3-4ja<br>III-3-4en<br>III-3-5ja | 右の指定国についての出願人である。<br>氏名(姓名)<br>Name (LAST, First)<br>あて名:                                     | 水田 美能<br>MIZUTA, Haruyoshi<br>231-0815 日本国<br>神奈川県 横浜市<br>中区千鳥町8番地<br>日石三菱株式会社 中央技術研究所内<br>c/o Central Technical Research Laboratory,<br>Nippon Mitsubishi Oil Corporation<br>8, Chidori-cho, Naka-ku<br>Yokohama-shi, Kanagawa 231-0815<br>Japan |
| III-3-5en                                      | Address:  |   |
| III-3-6<br>III-3-7                             | 国籍 (国名)<br>住所 (国名)  | 日本国 JP<br>日本国 JP  |
| IV-1<br>IV-1-1ja<br>IV-1-1en<br>IV-1-2ja       | 代理人又は共通の代表者、通知のあて名<br>下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。<br>氏名(姓名)<br>Name (LAST, First)<br>あて名: | 代理人 (agent)<br><br>平木 祐輔<br>HIRAKI, Yusuke<br>105-0001 日本国<br>東京都 港区<br>虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3F<br>Toranomon No.5 Mori Building Third Floor,<br>17-1, Toranomon 1-chome<br>Minato-ku, Tokyo 105-0001<br>Japan                                      |
| IV-1-2en                                       | Address:  |   |
| IV-1-3<br>IV-1-4                               | 電話番号<br>ファクシミリ番号  | 03-3503-8637<br>03-3503-0414  |
| IV-2<br>IV-2-1ja<br>IV-2-1en                   | その他の代理人<br><br>氏名<br>Name(s)  | 筆頭代理人と同じあて名を有する代理人<br>(additional agent(s) with same address as first named agent)<br>石井 貞次; 野村 健一<br>ISHII, Sadaji; NOMURA, Ken-ichi   |
| V<br>V-1                                       | 国の指定<br>広域特許<br>(他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)   | DESIGNATION OF STATES<br>EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT<br>LU MC NL PT SE<br>及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国  |
| V-2  | 国内特許<br>(他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)   | AU CA CN IL KR NO US  |





## 特許協力条約に基づく国際出願願書

PH-1063-PCT




原本(出願用) - 印刷日時 2000年09月22日 (22.09.2000) 金曜日 13時50分47秒

|         |   |                          |               |
|---------|---|--------------------------|---------------|
| V-5     | 指定の確認の宣言<br>出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。 |                          |               |
| V-6     | 指定の確認から除かれる国  | なし (NONE)                |               |
| VI-1    | 先の国内出願に基づく優先権主張   | PRIORITY CLAIM           |               |
| VI-1-1  | 先の出願日   | 1999年09月30日 (30.09.1999) |               |
| VI-1-2  | 先の出願番号  | 特願平11-279337             |               |
| VI-1-3  | 国名  | 日本国 JP                   |               |
| VI-2    | 優先権証明書送付の請求<br>上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。  | VI-1                     |               |
| VII-1   | 特定された国際調査機関 (ISA)   | 日本国特許庁 (ISA/JP)          |               |
| VIII    | 照合欄   | 用紙の枚数                    | 添付された電子データ    |
| VIII-1  | 願書  | 5                        | -             |
| VIII-2  | 明細書 (配列表を除く)  | 9                        | -             |
| VIII-3  | 請求の範囲   | 1                        | -             |
| VIII-4  | 要約  | 1                        | abst1063.txt  |
| VIII-5  | 図面  | 0                        | -             |
| VIII-6  | 明細書の配列表   | 2                        | -             |
| VIII-7  | 合計  | 18                       |               |
| VIII-8  | 添付書類  | 添付                       | 添付された電子データ    |
| VIII-8  | 手数料計算用紙   | ✓                        | -             |
| VIII-9  | 別個の記名押印された委任状   | ✓                        | -             |
| VIII-14 | 寄託した微生物又は生物材料に関する書面   | ✓                        | -             |
| VIII-15 | 計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又は7ミ/酸配列リスト  |                          | 別個のフレキシブルディスク |
| VIII-16 | PCT-EASYディスク  | -                        | フレキシブルディスク    |
| VIII-17 | その他   | 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面  | -             |
| VIII-17 | その他   | 国際事務局の口座への振込を証明する書面      | -             |
| VIII-17 | その他   | 陳述書                      | -             |
| VIII-17 | その他   | FDの情報を記録した書面             | -             |
| VIII-18 | 要約書とともに提示する図の番号   |                          |               |



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年09月22日（22.09.2000）金曜日 13時50分47秒

|         |             |  |
|---------|-------------|--|
| VIII-19 | 国際出願の使用言語名: | 日本語 (Japanese)   |
| IX-1    | 提出者の記名押印    |   |
| IX-1-1  | 氏名(姓名)      | 平木 祐輔  |
| IX-2    | 提出者の記名押印    |   |
| IX-2-1  | 氏名(姓名)      | 石井 貞次  |
| IX-3    | 提出者の記名押印    |  |
| IX-3-1  | 氏名(姓名)      | 野村 健一  |

## 受理官庁記入欄

|        |  |        |
|--------|--|--------|
| 10-1   | 国際出願として提出された書類の実際の受理の日                                   |        |
| 10-2   | 図面:  |        |
| 10-2-1 | 受理された  |        |
| 10-2-2 | 不足図面がある  |        |
| 10-3   | 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日） |        |
| 10-4   | 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日                          |        |
| 10-5   | 出願人により特定された国際調査機関  | ISA/JP |
| 10-6   | 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない                         |        |

## 国際事務局記入欄

|      |           |  |
|------|-----------|--|
| 11-1 | 記録原本の受理の日 |  |
|------|-----------|--|

